

学校编码: 10384
学号: 30520101152490

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

帕金森病相关基因的筛查和检测

The screening and detection of Parkinson's disease
related genes in Chinese population

李志明

指导教师姓名: 郑立谋 教授

曾骥孟 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2013 年 4 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录	
摘 要	1
Abstract	2
第一章 应用目标基因捕获测序技术筛选 PD 相关基因突变	4
第一节 引言	4
第二节 材料与方法	6
2.1 材料	6
2.2 方法	6
第三节 实验结果	13
3.1 测序质量评估结果	13
3.2 全基因组比对结果	13
3.3 全捕获区域分析结果	14
3.4 目标基因区域分析结果	15
3.5 SNV 变异度分析结果	17
第四节 讨论	18
4.1 捕获测序的优缺点	18
4.2 捕获测序在外显子上发现的新突变	18
参考文献	21
第二章 限制性片段长度多态性用于 PD 相关基因多态性分析	22
第一节 引言	22
第二节 材料和方法	24
2.1 材料	24
2.2 方法	25
第三节 实验结果	31
3.1 定点突变结果	31
3.2 酶切片段的琼脂糖电泳结果	31

3.3 酶切片段的毛细管电泳结果	32
3.4 等位基因频率和基因型频率分布	33
第四节 讨论	35
参考文献	37
综述 帕金森病和癌症的连接点——炎症	40
硕士期间发表论文	56
致 谢	57

Content

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
Chapter I Screening the novel variants of PD related genes by capture sequencing	4
Section I Introduction	4
Section II Materials and methods	6
2.1 Materials.....	6
2.2 Methods.....	6
Section III Results	13
3.1 Sequencing quality evaluation.....	13
3.2 Genome mapping.....	13
3.3 Captured region analysis.....	14
3.4 Targeted region analysis.....	15
3.5 SNV variability analysis.....	17
Section IV Discussion	18
4.1 Advantage and disadvantage of capture sequencing.....	18
4.2 Novel variants in exons of captered genes.....	18
References	21
Chapter II Detecting the polymorphisms of PD related genes by RFLP	22
Section I Introduction	22
Section II Materials and methods	24
2.1 Materials.....	24
2.2 Methods.....	25
Section III Results	31

3.1 Site-directed mutations	31
3.2 Agarose electrophoresis of enzyme digested fragments	31
3.3 Capillary electrophoresis of enzyme digested fragments	32
3.4 Distribution of allele frequencies and genotype frequencies	33
Section IV Discussion	35
References	37
Review Inflammation links PD and cancer.....	40
Published articles	56
Acknowledgement.....	57

摘 要

帕金森病 (Parkinson's disease, PD), 又称“震颤麻痹”, 是继老年痴呆症之后的第二大神经退行性疾病。临床将 PD 分为特发性/散发性 PD、家族性/遗传性 PD、继发性 PD 和帕金森综合征。家族性 PD 占 3% - 30%左右, 家族性 PD 的遗传类型包括常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及其它不确定遗传类型。家族性帕金森病虽少见, 但为研究帕金森病的遗传因素提供了条件。通过研究与家族性帕金森病发病相关的基因突变导致多巴胺能神经元变性死亡的机制, 将有利于了解大多数帕金森病患者的发病原因及防治措施。近年来遗传学研究发现了 *α -synuclein (SNCA)*、*LRRK-2*、*GBA*、*Parkin*、*PINK1*、*DJ-1*、*ATP13A2* 等致病基因, 并且发现这些相关基因的突变与左旋多巴敏感的帕金森综合征有关。但是, 绝大多数的 PD 为散发性, 且散发性 PD 确切病因至今未明。遗传因素、环境因素、年龄老化、氧化应激等均可能参与帕金森多巴胺能神经元的变性死亡过程。遗传因素在 PD 发病机制中的作用越来越受到学者们的重视, 目前已经发现了部分 PD 易感基因和致病基因。这种遗传研究大大地帮助了人们对 PD 的发生机制的了解, 也必将有助于人们找到治疗 PD 的新手段。

第一章, 我们利用捕获测序技术在 200 个中国汉族 PD 患者中筛查了与 PD 相关的 48 个基因, 包括编码区与非编码区, 并且发现了新的遗传变异, 这为以后深入了解 PD 的分子机制提供了参考位点。

第二章, 我们采用限制性长度多态性 (Restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 对 237 个 PD 患者和 190 个对照首次检测了与 PD 发生相关的 5 个突变位点: E46K (*SNCA*, rs104893875), A1442P (*LRRK2*), IVS9 (*Parkin*), A350V (*SLC41A1*), P268S (*NOD2*, rs2066842), 并且验证了 G2385R (*LRRK2*, rs34778348)。最后发现 P268S 与中国汉族 PD 显著相关, 暗示了 P268S 可能是中国汉族 PD 的风险因子。此外, 我们还建立了毛细管电泳 (Capillary electrophoresis, CE) 快速检测酶切片段的方法和通过引物重叠 PCR 定点突变技术设计了质粒标准品, 方便 PD 基因多态性分析的临床普及。

最后附录了一篇关于炎症联系 PD 和癌症的综述, 提出了炎症是联系 PD 和癌症的连接点。在这篇综述中我们提出了 PD 和癌症涉及的共同基因和通路, 特

别是慢性炎症为这两种疾病制造了容易使 DNA 发生累积突变的微环境，破坏了细胞稳态并恶化了病情，但是由于细胞背景不同产生了不一样的结果。

关键词：帕金森病；捕获测序；限制性片段长度多态性；炎症；癌症

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Parkinson's disease (PD), also known as the "parkinsonism", is the second largest neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. At present, the exact pathology of PD is not clear. Genetic factors, environmental factors, aging, and oxidative stress are considered to jointly play important roles in the process of premature death of dopaminergic neurons in PD. The role of genetic factors in the pathogenesis of PD is increasingly attracting the attention of the scholars. Some susceptible genes and causing genes of PD are found. The genetic studies are greatly helpful to understand the mechanisms of PD and would promote to find new the treatment of PD.

In the first chapter, we used capture sequencing to screen 48 PD related genes, including coding regions and non-coding regions, among 200 PD patients of Chinese Han population. We found some novel genetic variants may be as candidate sites for further studies.

In the second chapter, we first time screened 5 genetic mutations of 5 PD related genes by PCR-RFLP, which are E46K (*SNCA*, rs104893875), A1442P (*LRRK2*), IVS9 (*Parkin*), A350V (*SLC41A1*), P268S (*NOD2*, rs2066842), among 237 Chinese PD patients and 190 controls. We also screened G2385R (*LRRK2*, rs34778348) in South China. Finally, we found P268S was significantly associated with PD suggesting that P268S may be as a novel risk factor for Chinese PD patients. Furthermore, we also established rapid detection method of enzyme digested fragments by capillary electrophoresis (CE) and designed plasmid controls through the site-directed mutation technology in this study, which would facilitate the analysis of polymorphisms of PD related genes in the clinical practice.

In the end, a review about inflammation links PD and cancer was enclosed. In this review, we listed some common genes and a pathway shared by PD and cancer. We proposed that the chronic inflammation play an important role in the two diseases, especially provide a microenvironment that easily accumulate mutations, destroyed the cell steady state and deteriorate the condition. However, due to different cell

background, dopaminergic neurons and tumor cells produce different reactions: premature death and proliferation.

Keywords: PD; capture sequencing; RFLP; inflammation; cancer

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 应用目标基因捕获测序技术筛选 PD 相关基因突变

第一节 引言

目标序列捕获测序是指将感兴趣的基因组区域定制成特异性探针，并与目标基因组 DNA 在序列捕获芯片（或溶液）进行杂交，将目标基因组区域的 DNA 片段进行富集后，再利用二代测序技术进行测序，以获得目标基因组序列的研究策略[1]。目前捕获芯片主要有以下 3 种：NimbleGeny 序列捕获芯片、Agilent SureSelect 目标富集系统及 Agilent SureSelect DNA 捕获芯片，与之相对应新一代测序方法有 Roche/454 GSFLXSystem、Illumina/Solexa Genome Analyzer 基因组分析平台、ABI/Agencourt SOLID 测序平台。序列捕获芯片可定向捕获基因组目标区域，其目标区域 DNA 既可以是连续的基因组序列，也可以是非连续的独立位点或外显子序列。具有高度灵活性、特异性及覆盖率的特点，随之的二代测序方法可直接解析数据产生高质量的序列读长，所得数据可靠。另外，相较 PCR，目标序列捕获芯片能快速完成富集步骤，过程便捷，并节省大量费用、时间、人力。应用序列捕获芯片结合二代测序技术已广泛应用于寻找未知的 SNP 位点、插入缺失及疾病相关基因的研究。

二代测序技术正在不断突破高通量以及低测序成本的极限，定向测序更是当前最有效控制测序成本同时获得关键序列信息的首选。NimbleGen 推出的序列捕获前的多样本混合实验方案[2]，希望以此更好地优化序列捕获技术以配合二代测序平台的高通量，进而减少实验时间并降低测序费用。这一新技术利用不同条形码序列来结合不同样本，然后混合一次实验中进外显子或定制目标区域的液相捕获。Illumina HiSeq 2000 测序原理和 Illumina Genome Analyzer 测序系统相似采用的可逆终止法的边合成边测序技术，这种新方法确保了高精确度和真实的一个碱基接一个碱基的测序，排除了序列方面的特殊错误，能够测序同聚物和重复序列。

近年来，随着流行病学调查及分子遗传学研究的深入，遗传因素在 PD 的发病机制中的重要作用越来越受到人们的重视。现在研究确认 PARK1-13 等 13 个以孟德尔遗传方式与 PD 连锁的基因位点[3]，其中 5 个以常染色体显性遗传，

4 个以常染色体体隐性遗传, 剩余 4 个基因的遗传方式还不清楚。*SNCA*、*parkin*、*DJ-1*、*UCH-L1*、*PINK1* 和 *LRRK2* 这 6 个基因已经被克隆。但是目前已确定的 PD 相关位点, 并不能完全解释 PD 的发病原因, 且绝大部分的散发性 PD 是由于环境因素诱发或者由环境因素和遗传因素共同作用的结果。PD 有多基因突变的特点, 因此对 PD 多个相关基因进行全面, 系统的研究和分析对于揭示 PD 的发病机制有着重要的现实意义。从遗传学角度进行 PD 的病因学研究, 将基因变异与临床表现结合起来, 对于寻找 PD 的发病机制、进行早期诊断和鉴别诊断、评价疗效、判断预后具有十分重要的意义。

本研究联合采用 NimbleGen 捕获芯片和 Illumina Hiseq2000 测序仪对混合成 4 份的中国汉族 200 例散发性 PD 例进行基因捕获测序。捕获测序的基因是通过 Genbank 数据库查找的和 PubMed 文献报道的与 PD 相关的 48 个基因。根据芯片和测序检出的 SNV 与 INEDL 参考到公共数据库 dbSNP 和 1000Genome 的数据进行比较分析, 目的使为了找出新的针对中国汉族 PD 的遗传变异, 为以后进一步研究这些遗传变异的分子机制奠定基础, 并且为识别 PD 易感者进行早期干预提供科学依据。

第二节 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 临床试验对象来源

PD 病例来源于厦门大学第一附属医院门诊、住院病人及四川华西医学院神经内科。均征得试验对象知情同意，本研究经过厦门大学第一附属医院伦理委员会的审批。

2.1.2 主要试剂

MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit, Cat.No.MGB400-04, 血液全基因组 DNA 提取试剂盒：台湾芮宝生医股份公司

TransStart FastPfu DNA Polymerase, Lot.No.AP221：北京全式金生物技术有限公司

Argrose, Lot.No.MC0831860112：上海生工生物工程股份有限公司

DL2,000 DNA Marker, Lot.No.D501A：大连宝生物工程有限公司

UniRed 核酸染料, Lot.No.UNI0100：北京有尼康生物科技有限公司

50×TAE：242gTris, 37.2g Na₂EDTA·H₂O, 57.1ml 醋酸，加 ddH₂O 至 1L

2.1.3 主要仪器和设备

MagCore Compact 核酸抽提仪：台湾芮宝生医股份公司

NanoDrop ND1000 分光光度仪：美国 NanoDrop 科技股份有限公司

Hirayama HVE-50 超高速高压灭菌器：日本 Hirayama 制造有限公司

LifePro PCR 扩增仪：杭州博日科技有限公司

HE-120 多功能水平电泳槽：上海天能科技有限公司

Tanon-2500 (R) 全自动数码凝胶图像分析系统：上海天能科技有限公司

DHG-9146A 电热恒温鼓风干燥箱：上海精宏实验设备有限公司

电热恒温水浴箱：厦门合力信仪器仪表有限公司

2.2 方法

2.2.1 实验对象的分组及资料收集

散发性 PD 例共 237 (女 94 人, 男 143 人) 例, 患者的平均年龄为 60.3±11.3 岁 (25~83), 发病的平均年龄为 56.4±10.8 岁 (23~80)。早发型 PD (发病年龄

<50 岁) 51 例 (21.5%); 晚发型 PD (发病年龄 \geq 50 岁) 186 例 (78.5%)。诊断标准参照 United Kingdom PD Brain Bank, 严重程度的判定标准为 Unified Parkinsons Disease Rating Scale (UPDRS)。所有就诊者均经两名神经专科医生进行问诊、内科及神经专科体检, 视情行头颅 MRI 等检查, 参照英国 PD 协会的诊断标准进行诊断, 有家族史的除外。收集 PD 病例的临床资料及外周抗凝全血 2ml, 血标本储存于-20℃冰箱。

2.2.2 DNA 的提取

利用 MagCore Compact 核酸抽提仪, 按照 MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit, Cat.No.MGB400-04, 全血基因组 DNA 抽提试剂盒的说明书操作, 步骤如下:

- (1) 将 1.1ml 的 PK Storage Buffer 加到有粉末状 Protein K (11mg) 管中, 涡旋混匀, Protein K (10mg/ml) 贮存于-20℃冰箱;
- (2) 将冻存-20℃的血液在 37℃的恒温水浴箱中溶解, 取 400 μ l 血液到无菌的 1.5ml Eppendorf 管中, 加入 40 μ l Protein K 作为样品管;
- (3) 启动核酸抽提仪电源, 打开前门, 取出试剂条架 (Cartridge rack) 插入试剂条, 向下摁后听到“咔”的一声完成摆放;
- (4) 取出管架 (T-rack) 按照图 2.1 摆样品管 (Sample tube), 吸管 (Tip) 和洗脱管 (Elution tube)。
- (5) 放回管架和试剂条架, 关毕前门, 根据试剂条的编号 (Code#102) 执行核酸抽提程序, 设置洗脱体积为 200 μ l, 将抽提好的 PD 血液 DNA 分组编号 P1-237, -20℃保存。

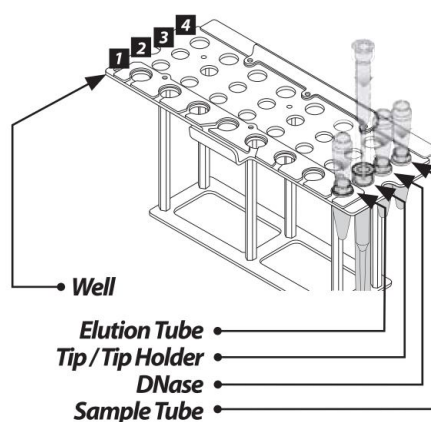



图 2.1 Tube 摆放示意图

图中 1, 2, 3, 4 分别表示: 洗脱管, 枪头/枪头槽, DNA 酶管, 样品管。
本次抽提不使用 DNA 酶, 所以 3 号位为空。

2.2.3 DNA 质量检测

(1) 检测提取的 DNA 浓度和纯度

- ① 双击  NanoDrop 软件图标，选择 “Nucleic acid”；
- ② 用移液枪加 2ul 的超纯水点在检测眼里，将信号接收器归位，运行操作软件 “OK” 键，仪器进入初始化状态；
- ③ 将对照样品上样，运行操作软件 “Blank” 键；
- ④ 将待测样品上样，运行操作软件 “Measure” 键；
- ⑤ 取 260/230nm 波长之吸光相关比值大于 1.8，260/280nm 波长之吸光相关比值介于 2.2 至 1.6 之间，DNA 总量大于 50 g 的样品；
- ⑥ 经测定将符合浓度与纯度要求的 DNA 样品分组编号 P1-200。

(2) 将符合标准的 DNA 样品分别做 PCR 扩增以检测 DNA 的完整性

- ① 应用软件 Primer Premier 5 设计 PD 易感基因 *SNCA* 的一个风险 SNP (rs104893875) 的上下游引物：

rs104893875-F: TGATGTGGGAACAAAGGGGA;

rs104893875-R: GTGTTTCCTGAAATGCACTCTGA;

扩增片段长度为 747bp;

- ② PCR 反应体系 (25μl)，如表 2.1 所示：

表 2.1 PCR 反应体系

Components	Storage Concentration	Volume (μl)	Final Concentration
TransStart buffer (Mg ²⁺)	5×	5	1×
dNTPs	2.5mM	2.5	250μM
FastPfu	2.5U/μl	0.5	1.25U
Forward Primer	10μM	0.5	0.2μM
Reverse Primer	10μM	0.5	0.2μM
Template DNA	≈50ng/μl	2	≈4ng/μl
Sterile ddH ₂ O	Not applicable	14	Not applicable

TransStart buffer (Mg²⁺): 100mM Tris-HCl, pH8.8, 50mM KCl, 50mM(NH₄)₂SO₄, 10mMgSO₄, 其他成分

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库